

CONCENTRAÇÕES DAS DROGAS EM TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

1. Estudo sôbre Sudan IV ⁽¹⁾

REAGENTS CONCENTRATIONS IN HISTOLOGICAL TECHNIQUES.

1. Study on Sudan IV

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS ⁽²⁾
NILZA BAPTISTA ⁽²⁾
ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI ⁽²⁾
MATHILDE TRIGO PIRES DE MESQUITA ⁽²⁾

SUMMARY

Excellent staining of lipidic materials in easily discerned bright red against a blue background is obtained by using Sudan IV and Ehrlich's hematoxyllin in concentrations lower than usually recommended. The procedure has been applied to sections from human organs, from inoculated animals and from cocoa seeds.

INTRODUÇÃO

Em virtude do elevado custo das drogas de laboratório e das dificuldades de importação, é de interesse verificar-se quais as mais baixas concentrações dessas drogas a serem usadas em técnicas histológicas, sem prejuízo dos resultados.

Neste trabalho demonstramos que a coloração de gorduras em tecidos, pelo Sudan IV e pela hematoxilina de Ehrlich, pode ser efetuada em concentrações bem mais baixas do que as usualmente recomendadas, com grande economia e bons resultados técnicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cortes de cinco autópsias efetuadas na Diretoria de Patologia ⁽³⁾, constituídos por tecidos de supra-renal, artéria com arteriosclerose, fígado com hepatite aguda fulminante, rim e fígado com esteatose e tecido celular subcutâneo; fragmen-

tos de coração e pulmão de ratos injetados com drogas colinérgicas, gentilmente cedidos pelo Dr. F. W. Eichmaum, e sementes de cacau, cortadas no criostato, cedidas pelo Dr. Yehuda Levanon. Todos os materiais escolhidos são tecidos ricos em gordura.

Drogas empregadas

1) *Fixadores*

a) Formol a 10% — mistura de formol a 40%, água destilada (10:90, v/v).

b) Formol tamponado neutro, 1:10

Formalina (Aldeído fórmico a 40%)	100 ml
Água destilada	900 ml
Fosfato de sódio monobásico	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	6,5 g

(1) Trabalho realizado na Seção de Anatomia Patológica da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Necrópcias n.º I. A. L. — 3882, 3897, 3905, 3881, 3930.

2) Corantes

- a) Sudan IV ou Scarlet R 0,04 g
Alcool a 70% 50 ml
Acetona 50 ml
- b) Hematoxilina de Ehrlich de fórmula conhecida, porém diluída em água destilada (1:6, v/v).

Nota — Ambos os corantes não cesessitam ser filtrados.

3) Soluções

- a) Alcool a 70%
- b) Gelatina de Kaiser
Gelatina 10 g
Água destilada 60 ml
Aquecer até a gelatina ficar dissolvida e acrescentar:
Glicerina 70 ml
Acido fenico 1 ml
(liquefeito em banho-maria)

Filtrar em estufa e, para conservar a solução, juntar 0,1 g de ácido fênico ou 0,01 g de mertiolato incolor.

No momento de ser usada, esta solução é posta em estufa a 58°C, para ser liquefeita.

Técnica para cortes de congelção

- 1) Fixar os tecidos em solução de Formol tamponado a 10% ou em Bouin.
- 2) Lavar os tecidos em água de torneira.
- 3) Fazer cortes com 10 ou 15 μ , no micrótomo de congelção.
- 4) Recolher os cortes em vasilhame com água de torneira.
- 5) Colocar os cortes em álcool a 70%, durante 2 minutos.
- 6) Corar os cortes no Sudan IV, durante 2 ½ a 5 minutos. O corante não necessita ser filtrado.

7) Lavar bem os cortes em álcool a 70%, até que o excesso do Sudan IV seja removido.

8) Lavar os cortes em água destilada, tomando cuidado para evitar dilacerção devido à diferença de tensão superficial dos dois líquidos (álcool e água).

9) Colocar os cortes na hematoxilina de Ehrlich, diluída mas não filtrada, durante 2 minutos. Cuidar do tempo, pois a permanência por mais de 2 minutos nessa solução daria coloração muito intensa da hematoxilina, prejudicando, assim, o aspecto da lâmina.

10) Passar os cortes 3 vezes em água de torneira, para retirar o excesso da hematoxilina, deixando-os na última água pelo menos 10 minutos para azulecer o suficiente.

11) Montar em gelatina de Kaiser previamente aquecida.

Técnica para cortes no criostato

- 1) Congelar no criostato durante ½ hora.
- 2) Cortar com 8 μ de espessura.
- 3) Com lâmina cuidadosamente limpa e seca, apreender o corte.
- 4) Colocar na estufa a 55°C, durante 10 minutos.
- 5) Deixar esfriar.
- 6) Colocar no formol a 10% ou em Bouin, por ½ hora, para fixar.
- 7) Lavar em água de torneira (duas mudanças).

Proceder à coloração normal anteriormente descrita para cortes de congelção, a partir do item 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Sudan IV¹ é solúvel nos lipóides², por isso aparecem como se fôsem corados; geralmente é usado a 1%, em partes iguais de álcool a 70% e acetona, solução que é

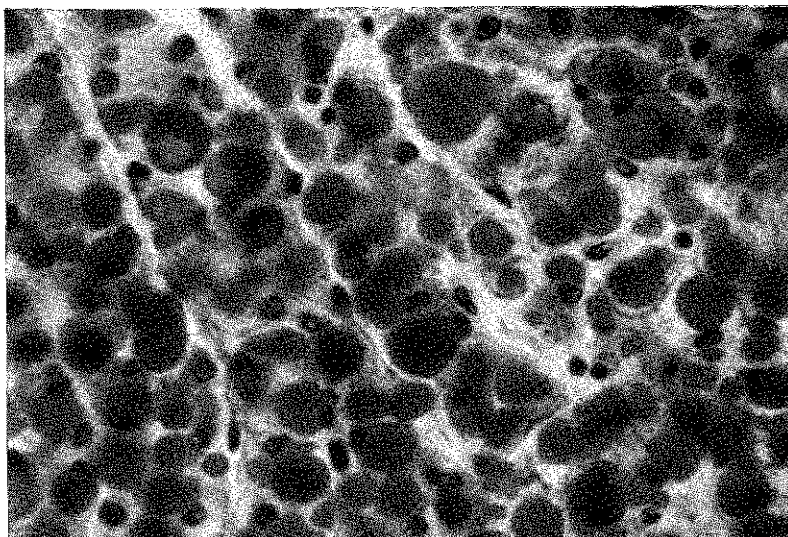


Fig. 1 — Corte de glândula supra-renal humana. Corte em congelação. Coloração pelo Sudan IV modificada. Fundo pela hematoxilina de Ehrlich.

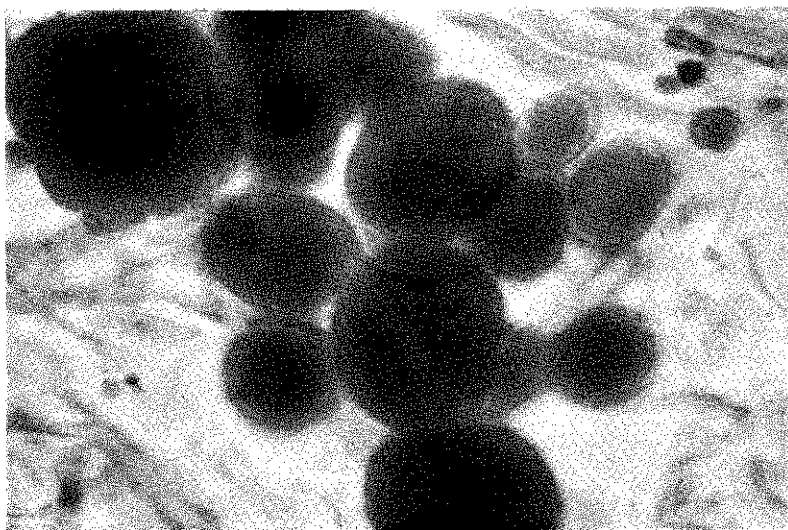


Fig. 2 — Corte de tecido celular sub-cutâneo. A mesma coloração da fig. 1.

saturada. Executamos colorações com várias concentrações e verificamos que o Sudan IV cora perfeitamente bem até a concentração de 0,04%. O mesmo fizemos com a hematoxilina de Ehrlich e constatamos que ela fornece melhores resultados na diluição de 1:6, v/v, do que na de 1:4, indicada por PEARSE³.

Utilizando-se as concentrações por nós determinadas, obtêm-se as seguintes vantagens:

- 1) Evita-se o desperdício de drogas.
- 2) Evita-se a filtração das soluções⁴.
- 3) As lâminas apresentam-se mais limpas e bem nítidas (Fig. 1 e 2). Os núcleos e as membranas citoplasmáticas das células apresentam-se de um azul intenso e o citoplasma, claro. Os lipóides dentro das células e os localizados nos interstícios celulares aparecem corados de vermelho alaranjado bem intenso.

Aconselhamos desprezar a solução usada de Sudan IV, quando empregada para corar órgãos muito ricos em lipóides, evitando-se desta maneira que os cortes isentos de gordura apresentem uma falsa positividade. Chamamos a atenção, também, para a limpeza da vidraria utilizada, bastando para isso limpá-la com algodão embebido em xilol, no qual o corante é solúvel.

CONCLUSÕES

Empregando-se as soluções de Sudan IV a 0,04% em álcool e acetona e a hematoxilina de Ehrlich diluída a 1:6 v/v, obtêm-se melhores resultados que os apresentados pelas soluções clássicas usualmente indicadas e utilizadas.

RESUMO

Foram utilizadas várias concentrações de Sudan IV e Hematoxilina de Ehrlich para colorações de gorduras em tecidos com a finalidade de se conseguir uma percentagem ideal que resultasse na economia de corante e apresentasse grande nitidez dos cortes histológicos. Isso foi conseguido nas concentrações de 0,04% para o Sudan IV e 1:6 v/v para a hematoxilina de Ehrlich, de acordo com a técnica indicada no texto.

Agradecimentos — Ao Dr. Antônio J. Brandi, Chefe da Seção de Anatomia Patológica, ao Dr. Juan J. Angulo, Chefe da Seção de Patologia Experimental, ao Dr. José C. Arminante, médico patologista da Diretoria de Patologia, à Dra. Yolanda Tavares, Chefe do Laboratório de Bioquímica e a Regina Celia Machado, estagiária nesta Diretoria. Ao Sr. Justino da Silva, da Diretoria dos Serviços Técnicos e Auxiliares, pela execução das microfotografias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LILLIE, R. D. — Histopatologic technique and practical histochemistry. 6. ed. New York, Blakiston, 1954. p. 300.
2. DE ROBERTIS, E. D. P. — Biología celular. Buenos Aires, El Ateneo, c1965. p. 116.
3. PEARSE, A. G. E. — Histoquímica teórica y aplicada. Versión española de Tomas Palomo Salas. Madrid, Aguilar, c1960.
4. HUMASON, G. L. — Animal tissue techniques. S. Francisco, Freeman, [c1962]. p. 255.

Recebido para publicação em 11 de abril de 1966.